Aus der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg i. Br.
(Direktor: Prof. Dr. Dr. L. Heilmeyer)

Über Versuche einer serologischen Krebsdiagnose auf immunologischer Basis unter besonderer Berücksichtigung der von Csaba und Törö angegebenen Agarbindungsreaktion

Kurzfassung der

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg i. Br.

vorgelegt von

Antje Elisabeth Brahms

aus
Esens in Ostfriesland

1 9 6 2

Dekan: Professor Dr. H. Krauss
Referent: Professor Dr. Dr. L. Heilmeyer

Sonderdruck
aus „Klinische Wochenschrift", 40. Jahrgang, 4. Heft, 15. Februar 1962, S. 201—205
Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg / J. F. Bergmann, München

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

Untersuchungen über die von Csaba und Törö angegebene Agarbindungsreaktion

Von
A. Brahms
Aus der Medizinischen Univ.-Klinik Freiburg i. Br. (Direktor: Prof. Dr. Dr. L. Heilmeyer)

Das Problem einer serologischen Krebsdiagnose ist in letzter Zeit immer wieder aufgegriffen worden. Auch Csaba und Törö[1] haben über eine Reaktion berichtet, die in hohem Maße krebsspezifisch sein soll. Sie leiten den immunologischen Charakter der angegebenen Reaktion folgendermaßen ab:

Das aggressive Wachstum der malignen Zellen verursacht im Organismus Veränderungen, die zu

immunologischen Reaktionen führen. Die bösartig wuchernden Zellen durchbrechen die Barriere der gesunden Zellen, die in erster Linie eine Hyaluronsäure-Heparin-Schranke sein soll. Bei der Zertrümmerung dieser Schranke gelangen deren Abbauprodukte, die polysaccharidähnlichen Charakter besitzen, in die Blutbahn. Gestützt wird diese Annahme durch Arbeiten verschiedener Autoren[2–4], die im Blute von Tumorkranken einen Anstieg der Mucopolysaccharide und ihrer Bausteine festgestellt haben.

Csaba und Törö nehmen nun an, daß diese Abbauprodukte, mit einem Protein gekoppelt, Antigene darstellen, wodurch eine Antikörperbildung ausgelöst werden könnte. Dieser hypothetische Antikörper müßte indirekt durch Substanzen, die dem Hapten chemisch ähnlich sind, nachweisbar sein. Die ungarischen Autoren verwendeten für diese Reaktion eine eigene Agar-Agar-Präparation.

Da die Hypothesen von Csaba und Törö sehr fragwürdig erscheinen, zumal bei anderen Krankheiten mit Gewebszerfall ebenfalls ein Anstieg der Mucopolysaccharide festgestellt wird, haben wir zunächst versucht, die Angaben der Autoren zu reproduzieren und dann den Mechanismus der Reaktion aufzuklären.

Methodik

0,2 ml Serum werden mit 0,2 ml physiologischer Kochsalzlösung 30 min in einem Wasserbad bei 56° C inkubiert. Unterdessen wird eine 2%ige, in physiologischer Kochsalzlösung angesetzte Agar-Agarlösung in heißem Wasser verflüssigt und ebenfalls auf einer Temperatur von 56° C gehalten. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden 0,2 ml der Agar-Agarlösung zu dem Serum-NaCl-Gemisch gegeben und durch Schütteln vermischt. Auf eine Agar-Agarplatte von 2 mm Schichtdicke, in die Löcher gestanzt werden, wurde das noch nicht erstarrte Reaktionsgemisch mit Pasteurpipetten eingefüllt. Anschließend wird die Agar-Agarplatte 30 min im Kühlschrank bei + 2° C aufbewahrt. Ist die Reaktion positiv, tritt eine deutliche Trübung gegenüber der Umgebung auf.

Im Verlaufe unserer Untersuchungen haben wir die oben beschriebene Methode vereinfacht:

Anstatt das Reaktionsgemisch in Agarschälchen zu füllen, wurden Kahnröhrchen verwendet, nachdem sich in Parallelversuchen keine unterschiedlichen Resultate ergeben hatten. Bei der Betrachtung der Röhrchen gegen Licht ist die Streuung des Lichtes durch die gebildeten Präcipitate gegenüber der Eigenstreuung des Agars am größten und dadurch die Trübung am augenfälligsten. Sie ist ein empfindlicher Ausdruck einer positiven Reaktion. In den folgenden Untersuchungen wurden die uns freundlicherweise von Csaba und Törö zur Verfügung gestellten Agaransätze verwendet. Da nach den Autoren lipämische Seren falsche positive Reaktionen ergeben sollen, wurde das Blut nur von nüchternen Patienten entnommen.

Ergebnisse

Insgesamt wurden die Seren von 243 gesunden und kranken Personen untersucht. Wie sich aus Tabelle 1 ergibt, gliederten sich diese in 73 gesunde Blutspender und 76 Tumorkranke auf. Die übrigen 94 Patienten hatten Krankheiten verschiedener Genese oder waren schwangere Frauen. Die von Csaba und Törö gefundenen Werte sind aus Tabelle 2 ersichtlich. Bei Vergleich beider Tabellen zeigt sich eine auffallende Übereinstimmung der positiven Reaktionen bei neoplastischen Erkrankungen. Ebenso entsprechen sich die „falschen“ positiven Reaktionen bei Gesunden. Wesentliche Abweichungen wurden jedoch bei den anderen Patienten gefunden. Positive Reaktionsausfälle traten besonders bei Graviden und Tuberkulösen auf. Bei den übrigen Erkrankungen erlaubt die zu

Tabelle 1. *Unsere Ergebnisse mit der Originalmethode*

	Gesamtzahl	Positive Fälle	
		Zahl	%
Gesunde Blutspender	73	10	13,7
Neoplasmen (nur fortgeschrittene Stadien)	76	64	85,2
Lungentuberkulosen	13	10	77
Lebercirrhose	8	5	62,5
Polyarthritis	14	10	71,5
Infekte	22	6	27
Diabetes mellitus	2	1	—
Gravidität	35	32	91

Tabelle 2. *Ergebnisse von* Csaba *und* Törö

	Gesamtzahl	Positive Fälle	
		Zahl	%
Gesunde	983	56	5,7
Histologisch gesicherte Neoplasien verschiedenster Lokalisation			
Carcinome	375	322	85,9
Sarkome (einschließlich Melanosarkome)	40	30	75,0
Lymphogranulomatosen	23	16	69,6
Leukämien	8	3	—
Nur klinisch-diagnostizierte Neoplasien	96	90	86,4
Präcancerosen (von den Autoren nicht näher gekennzeichnet)	28	24	85,7
Krankheiten anderer Genese			
Diabetes mellitus	24	1	—
Hepatitis	7	—	—
Lues	8	—	—
Polyarthritis rheumatica	18	2	11
Lungentuberkulose	62	5	8
Cholelithiasis	22	7	6,1
Prostatahypertrophie	5	3	—

geringe Zahl der Fälle keine genauere Aussage. Jedoch ergaben sich auch hier „falsche“ positive Werte.

Der hohe Prozentsatz der „falschen“ positiven Reaktionen setzt die Bedeutung der Agarbindungsreaktion als differentialdiagnostisches Kriterium wesentlich herab. Wegen der Unspezifität der Reaktion ist es zweifelhaft, ob überhaupt immunologische Vorgänge der Agarbindungsreaktion zugrunde liegen.

Um die Rolle etwaiger immunologischer Mechanismen aufzuklären, wurden die folgenden Untersuchungen angeschlossen.

Untersuchungen zur Aufklärung der Reaktion

1. Wenn gegen Polysaccharide gerichtete Immunvorgänge der Agarbindungsreaktion zugrunde liegen, so müßte sie auch mit anderen kommerziell hergestellten Agarsorten hohen Reinheitsgrades bei Variation des Polymerisations- und Verzweigungsgrades durchführbar sein. Als Vergleichspräparat verwendeten wir den von der Firma Difco, Chicago, hergestellten Bacto-Agar, Charge Nr. 437380 und veränderten die Vernetzungsstruktur stufenweise durch Autoklavieren bis zum Ausbleiben der Gelierfähigkeit, wobei anschließend der p_H-Wert durch Zugabe von n/10 NaOH auf ungefähr 7 eingestellt wurde. Obwohl die Reaktion mit diesen Agar-Agarpräparationen in derselben Weise vorgenommen wurde wie mit dem ungarischen Agar-Agar, war die Reaktion wesentlich schwächer, d. h. Trübungen waren kaum erkennbar. Alle 76 untersuchten Seren von Krebskranken ergaben mit den verschiedenen Präparationen von Difco-Agar höchstens

(+)-Resultate, wogegen mit ungarischem Agar-Agar die Reaktionsintensität als +++ bezeichnet werden konnte.

Um von eventuellen Hemmungszonen unabhängig zu sein, haben wir auch die Konzentrationen der Agar-Agar-Präparationen variiert. Hierbei zeigte sich, daß die Reaktion bei den Konzentrationen 0,5; 1; 2 und 4% unbeeinflußt von der jeweiligen Agar-Agarkonzentration blieb, d. h. der Ausfall der Reaktion wurde weder abgeschwächt noch verstärkt.

2. Bei der Ouchterlony-Technik diffundieren zwei Reaktionspartner im Agar-Agarmilieu gegeneinander, wobei vor allem bei Antigen-Antikörperreaktionen Präcipitatlinien auftreten. Betrachtet man den Agar-Agar als den einen Reaktionspartner und das Serum als den anderen, so müßte die Ouchterlony-Technik einen sehr empfindlichen Indikator der Agarbindungsreaktion darstellen. Wir haben deshalb einen Teil der zur Verfügung stehenden Seren einer modifizierten Ouchterlony-Technik (s. unten) unterworfen.

Modifizierte Ouchterlony-Technik: 2,5 ml einer 1; 1,5 und 2%igen Agar-Agarlösung wurden auf Objektträger gegossen und in den erstarrten Agar-Agar Löcher gestanzt, in die das unverdünnte Serum gefüllt wird. Anschließend inkubierten wir die Objektträger bei 56° C. Die Reaktion wurde dann als positiv bewertet, wenn nach 60—90 min ein Präcipitationsring aufgetreten war. Sie ist auch bei Zimmertemperatur durchführbar, die Ablesung kann in diesem Falle aber erst nach 24 Std erfolgen.

Bei Anwendung der Ouchterlony-Technik ergab sich völlige Übereinstimmung mit den von uns nach der Originalmethode von CSABA und TÖRÖ gefundenen Ergebnissen (Tabelle 3). Auch hier zeigte sich der Difco-Agar-Agar reaktionsschwächer als der ungarische Original-Agar-Agar. Ebenso war die Agar-Agar-Konzentration und -Präparation wieder ohne Einfluß auf den Reaktionsablauf. Dabei fiel auf, daß nach längerem Stehen (etwa 24 Std), zunächst negative Reaktionen positiv wurden.

Tabelle 3. *Gegenüberstellung der ABR und modifizierten Ouchterlony-Technik*

	Positiv nach ABR	Positiv nach OUCHTERLONY
Gesunde	—	1
Neoplasma	12	11
Lungentuberkulose	6	6
Polyarthritis rheumatica	5	4
Gravidität	5	5

Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß jedes, auch normales Serum fähig ist, mit dem ungarischen Agar-Agar zu präcipitieren. Zwischen normalen und Tumorseren bestehen demnach nur quantitative Unterschiede bezüglich der Schnelligkeit des Reaktionsablaufes, nicht aber qualitative.

3. Aus der Tatsache, daß mit Heparin die Agarbindungsreaktion gehemmt werden kann, leiten CSABA und TÖRÖ den immunologischen Charakter der Reaktion ab, da Heparin ein Mucopolysaccharid sei und somit wie der Agar-Agar als Antigenvertreter angesehen werden könne. Auch wir konnten in Vorversuchen feststellen, daß nach Zugabe von Heparin normalerweise positive Seren keine Reaktion mehr zeigten.

Unter der Voraussetzung, daß Heparin mit dem Serum reagiert, müßten Aggregate entstehen, die im Grenzschichtreaktiometer nachweisbar sind.

Prinzip des Grenzschichtreaktiometers. In einer kleinen Cuvette werden zwei Reaktionspartner geschichtet. Durch Einschwenken der Cuvette in einen vertikalen Strahlengang wird das vom Cuvetteninhalt unter bestimmten Winkeln abgelenkte Licht (2—25°) von einem Photoelement empfangen und über einen Galvanometer angezeigt. Im Verlauf des Konzentrationsausgleiches diffundieren beide Reaktanten ineinander. In den Zonen optimaler Konzentration werden Aggregate gebildet, die auf Grund erhöhter Lichtablenkung gemessen werden können. Mit diesem Verfahren wurden bereits früher Präcipitate nachgewiesen, die mit dem bloßen Auge nicht mehr erkennbar waren und auch in der Ouchterlony-Technik keinen positiven Befund ergaben[5–7]. Für die Überschichtungsversuche wurden 0,05%ige und 0,5%ige Heparinlösungen verwendet. Als Lösungsmittel wurde NaCl-Boratpuffer benutzt. (Zur Messung gelangten nur Seren, die in der Agarbindungsreaktion eine deutlich positive Reaktion ergaben. Das Verdünnungsverhältnis der Seren mit NaCl-Boratpuffer betrug 1:4 und 1:8).

Bei all diesen Untersuchungen waren im Grenzschichtreaktiometer keine positiven Reaktionsabläufe erkennbar. Hieraus kann geschlossen werden, daß keine Aggregatbildung bei der Reaktion zwischen dem Serum und Heparin auftritt.

4. Um eine mögliche Beteiligung von Immunglobulinen an der Agarbindungsreaktion auszuschließen, wurden in einem weiteren Versuch von zwei in der ABR stark positiven Seren die Fraktionen γ, β_2 M und β_2 A mit spezifischen Antiseren gefällt. Als Kontrolle wurden zwei negative Seren in derselben Weise behandelt. Von den Antiseren wurde jeweils eine geometrische Verdünnungsreihe von 1:2 bis 1:16 angesetzt und die zu untersuchenden Seren im Verhältnis 1:2 mit den Stufen der jeweiligen Verdünnungsreihe gemischt. Vom jeweiligen Überstand wurde dann der Versuch in der modifizierten Ouchterlony-Technik (s. 2.) wiederholt. Das Ergebnis fiel folgendermaßen aus: Die ursprünglich positiven Seren blieben auch nach vollständiger Befreiung von Immunglobulinen weiterhin positiv, wogegen die ursprünglich negativen Seren auch weiterhin eine negative Reaktion zeigten. Dies beweist, daß zumindest die bekannten Immunglobuline nicht an der Agarbindungsreaktion beteiligt sind.

5. Nach CSABA und TÖRÖ sind lipämische Seren für die Agarbindungsreaktion ungeeignet, da auf Grund des erhöhten Lipoidgehaltes falsche positive Ergebnisse erzielt werden. Dabei handelt es sich nicht allein um eine optische Trübung, bedingt durch die Eigentrübung des Serum, sondern das Lipoid selbst soll vielmehr mit dem Agar-Agar reagieren können und eine massive Trübung ergeben.

In unseren Untersuchungen wurden, wie schon erwähnt, deutlich lipämische Seren von vornherein ausgeschieden. Um auch die nicht lipämischen Seren weitgehend zu „klären", haben wir die Seren vor Durchführung der Agarbindungsreaktion mit Äther extrahiert.

Als Ergebnis zeigte sich, daß der Fettgehalt der Seren die Agarbindungsreaktion in keiner Weise beeinflussen konnte; denn unbehandelte ebenso wie extrahierte Seren vermochten keine Änderung des Reaktionsablaufes hervorzurufen. Es muß daher angenommen werden, daß der Fettgehalt für unspezifische positive Reaktionsausfälle nicht verantwortlich ist.

Da nach unseren bisherigen Untersuchungen bei Krebspatienten kein „Schwarz-Weiß-Effekt" erzielbar war, bestand noch die Möglichkeit, daß quantitative Unterschiede der Reaktion eventuell bestimmten Krankheiten zugeordnet werden könnten. Es wurde

Tabelle 4. *Ausfall der Agar-Bindungsreaktion bei ätherextrahierten und unbehandelten Seren*

Fall	Geschlecht	Unbehandeltes Serum	Äther-extrahiertes Serum
S. Sp.	♂	++	+++
K. R.	♂	(+)	(+)
L. A.	♀	∅	∅
N. R.	♂	∅	∅
S. A.	♀	+	++
D. O.	♂	+++	++
S. L.	♀	+++	+++
T. R.	♀	∅	∅
S. R.	♀	+	+
E. K.	♂	++	++

deshalb noch die Reaktion durch objektive Bestimmung der Trübung des Reaktionsgemisches verfolgt.

6. Mit Hilfe eines empfindlichen Trübungsgerätes[8] (Helkoturbid) wurde die Trübungszunahme des Reaktionsgemisches in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Um die Eigentrübung des Agars beim

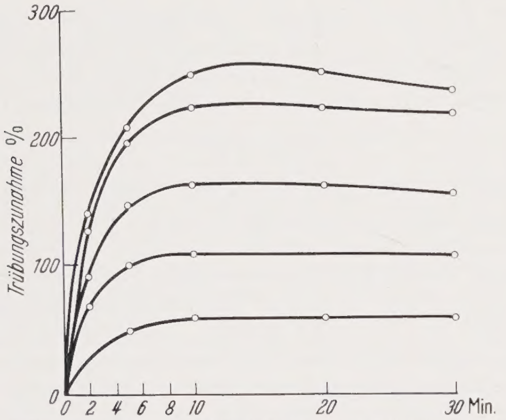

Abb. 1. Trübungszunahme in Abhängigkeit von der Zeit bei verschiedenen Carcinomen

Abkühlen als Unsicherheitsfaktor auszuschließen, haben wir das Serum-NaCl-Gemisch und den Agar temperaturkonstant gehalten und als Zeitpunkt „Null" den der Mischung beider bestimmt.

Abb. 1 zeigt, daß allein schon bei Carcinomen alle nur möglichen Streuwerte vorkommen können, von einer negativen bis zu einer massiven positiven Reaktion.

7. Da auf Grund der bisherigen Ergebnisse die Agarbindungsreaktion wie eine Serumlabilitätsreaktion verläuft, wurden verschiedene Serumlabilitätsreaktionen gleichzeitig mit der Agarbindungsreaktion durchgeführt. Außerdem wurde sie mit der Blutsenkungsgeschwindigkeit, den Kupfer-Eisen-Werten des Serums und den Daten der Elektrophorese (α_2-Globuline) verglichen. Hierbei zeigte sich (Tabelle 5) eine Übereinstimmung in etwa 76% der Fälle

Tabelle 5. *Konkordanz (K) bzw. Diskordanz (D) der ABR mit einigen Serumlabilitätsreaktionen, den Kupfereisenwerten des Serums, und der α_2-Vermehrung*

Positive und negative ABR wurden mit den entsprechenden pathologischen bzw. nichtpathologischen Werten verglichen.

$MgSO_4$		BSG		Takata		Weltmann		Thymol		Cu	Fe		α_2-Vermehrung	
K	D	K	D	K	D	K	D	K	D	K D	K	D	K	D
29	9	25	12	12	14	14	12	11	15	12/10	12	10	29	18

mit der Magnesiumsulfatpräcipitation[9]. Eine geringere Konkordanz besteht zu der Blutsenkungsgeschwindigkeit (bei etwa 67% der Fälle). Bei der Takata-Ara-Reaktion, der Thymolprobe, dem Weltmannschen Coagulationsband, den Kupfer-Eisen-Werten und den Daten der Elektrophorese bestand keine Relation zur Agarbindungsreaktion. Letzteres ist insofern bedeutsam, als bei Zuständen mit erhöhtem Zellzerfall, insbesondere bei malignen Tumoren (Nekrosen) einerseits die α_2-Globuline meist erhöht sind, wie auch andererseits die Agarbindungsreaktion in solchen Fällen häufig positive Reaktionen ergibt.

Diskussion

Unsere Untersuchungen haben zunächst gezeigt, daß die von CSABA und TÖRÖ angegebene Agarbindungsreaktion in 85% der geprüften Seren krebskranker Patienten in Übereinstimmung mit den Autoren positive Reaktionsausfälle ergab. Bei Anwendung der Reaktion auf Seren von Patienten mit Erkrankungen anderer Genese fanden wir aber ebenfalls in einem hohen Prozentsatz (27—91%, je nach Diagnose) „falsche" positive Ergebnisse. Nach diesen Befunden ist die diagnostische Bedeutung der Agarbindungsreaktion bei Krebskranken recht zweifelhaft.

Die weitere Aufklärung des Reaktionsmechanismus zeigte darüber hinaus, daß jedes, auch normales Serum fähig sein kann, mit dem Original-Agar zu reagieren. Ein grundsätzlicher Unterschied zwischen Seren normaler und krebskranker Patienten kann somit bezüglich der Agarbindungsreaktion nicht bestehen. Im übrigen weist die Untersuchung mit einem anderen handelsüblichen Agar-Agar (Difco), die nur zu negativen Ausfällen führte, daraufhin ,daß dem Agar-Agar in der Agarbindungsreaktion nicht die entscheidende Rolle zukommt, welche CSABA und TÖRÖ ihm zuschreiben. Bei Ersatz des Agar-Agars durch einen anderen „Antigenvertreter", wie z. B. durch das Heparin, fand keine nachweisbare Reaktion mit den Seren statt. Ferner konnte bewiesen werden, daß die bekannten Immunglobuline γ, β_2 M und β_2 A nicht für den Ausfall der Agarbindungsreaktion verantwortlich sind. Demnach ließen sich keine Anhaltspunkte für den immunologischen Charakter der Agarbindungsreaktion gewinnen, wie dies von den ungarischen Autoren behauptet wird. Die Möglichkeit, die Agarbindungsreaktion mit Heparin zu hemmen, beruht u. E. nicht auf der immunologischen Adsorption eines krebsspezifischen Antikörpers, sondern vielmehr auf der Wirkung des Heparins auf die Serumeiweißkörper[10]. Dieses führt nämlich auf der basischen Seite des isoelektrischen Punktes der Eiweißkörper zu ihrer Stabilisierung, wogegen auf der sauren Seite Präcipitation erfolgt. Eigene, noch unveröffentlichte Untersuchungen über die Wirkung von Heparin auf die $Mg\text{-}SO_4$-Reaktion sprechen in diesem Sinne. Unsere Untersuchungsergebnisse deuten vielmehr darauf hin, daß die Agarbindungsreaktion lediglich eine Eiweißlabilitätsprobe darstellt, zumal Vergleiche mit den in der Klinik gebräuchlichen Untersuchungsmethoden (BSG, Cu-Fe, Takata-Ara, Thymol, Weltmannsche Coagulationsband usw.) bei einigen der Methoden eine auffallende Übereinstimmung ergaben.

Zusammenfassung. Die von CSABA und TÖRÖ angegebene Agarbindungsreaktion, die ein spezifisch-serologisches Krebsdiagnosticum sein soll, wurde auf

Reproduzierbarkeit und ihren immunologischen Mechanismus hin untersucht. Dabei zeigte sich, daß es sich um eine unspezifische Reaktion handelt, die am ehesten einer Serumlabilitätsreaktion entspricht.

Literatur. [1] Csaba, G., u. J. Törö: Z. Krebsforsch. **62**, 481 (1958). — [2] Boyd, W. C.: The proteins. New York: Academic Press. — [3] Brdicka, C.: Zit. nach Kent u. Whitehouse, Biochemistry of aminosugar. London 1955. — [4] Greenstein, J. P.: Biochem. of cancer. New York: Academic Press 1954. — [5] Kleine, N., M. Matthes u. W. Müller: Acta haemat. (Basel) **18**, 377 (1957). — [6] Kleine, N., M. Matthes u. W. Müller: Z. Rheumaforsch. **17**, 206 (1958). — [7] Kleine, N., W. Müller u. M. Matthes: Z. Immunforsch. **115**, 380 (1958). — [8] Kleine, N., M. Matthes u. W. Müller: Klin. Wschr. **35**, 132 (1957). — [9] Kleine, N., W. Müller u. M. Matthes: Klin. Wschr. **36**, 513 (1958). — [10] Keller, G., u. W. Merz: Gynaecologia (Basel) **136**, 5 (1953).

Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545301_0023

Lebenslauf

Am 29. Oktober 1935 wurde ich, Antje Elisabeth Brahms, als Tochter des praktischen Arztes Dr. med. Johann Brahms und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Andreesen, in Esens/Ostfriesland geboren. Nach Absolvierung der dortigen Volks- und Mittelschule besuchte ich das „Ulricianum" (Gymnasium mit Oberschule) zu Aurich/Ostfriesland und legte dort am 28. Februar 1955 das Abitur ab. Nach $^1/_2$jähriger Tätigkeit in der Krankenpflege begann ich das Medizinstudium in Göttingen, wo ich im Juli 1958 das Physikum machte. Die klinischen Semester verbrachte ich in Göttingen, Wien und Freiburg. Dort bestand ich nach elf Studiensemestern im November 1961 das Staatsexamen. Mit der vorliegenden Arbeit begann ich im Sommer 1959.